

На правах рукописи

ГАЛИЦКАЯ ПОЛИНА ЮРЬЕВНА

**МИКРОБНЫЙ КОНТАКТНЫЙ ТЕСТ НА ОСНОВЕ *BACILLUS PUMILUS*  
ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ И ОТХОДОВ**

03.00.16 – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2006

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии экологического факультета Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор Селивановская Светлана Юрьевна

доктор биологических наук,  
профессор Яковлев Валерий Анатальевич

Официальные оппоненты:  
кандидат биологических наук, старший  
преподаватель Киямова Светлана Наильевна

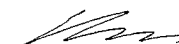
Ведущая организация: Татарский Государственный Гуманитарно-  
Педагогический Университет, г. Казань

Защита диссертации состоится 14 ноября 2006г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 212.081.19 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «\_\_\_» октября 2006г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,  
доктор химических наук



Г.А. Евтюгин

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Растущая антропогенная нагрузка на экосистемы диктует необходимость разработки системы мер по ее минимизации. Для эффективного природоохранного управления необходима информация о степени опасности загрязняющих веществ для окружающей среды, прежде всего, их токсичности (Filip, 2002; Ладонин, Пляскина, 2004; Feisthauer et al., 2005; Fernandez et al., 2005; Classens et al., 2006; Судницын, 2006). В настоящее время наряду с методами химического анализа для оценки состояния природных и антропогенных объектов все чаще используются биологические методы. Наиболее сложны для анализа плотные многокомпонентные объекты, такие как почва, бытовые и промышленные отходы (Латыпова с соавт., 2002; Malkomes, 2006).

Одно из перспективных направлений в оценке плотных многокомпонентных сред - микробные тесты (Abbondanzi et al., 2003; Kookana et al., 2004; Van Beelen, 2003; Hinojosa et al., 2004; Rajapaksha, 2004). Наиболее разработаны методы, основанные на оценке аборигенной микрофлоры, которые являются достаточно простыми и чувствительными к токсикантам (Хазиев, 2005; Moreno et al., 2006; Sauve, 2006; Palmroth et al. 2006). Однако при интерпретации результатов зачастую возникают проблемы, связанные с отсутствием незагрязненного образца, идентичного анализируемому. Альтернативой указанным методам являются методы биотестирования, основанные на оценке ответной реакции интродуцированной микрофлоры (Roenpapel et al., 1998; Athiainen et al., 2002). В настоящее время разработано большое количество таких тестов, включая ряд коммерческих, однако в основном они предназначены для оценки токсичности водных образцов (Каранен, Itavaara, 2001; Селивановская, 2004; Classens et al., 2006). В случае же тестирования плотных образцов обязательная процедура - это получение водного экстракта (ISO 10712: 1995 (E), 1995; ПНД Ф Т 14.1.2.3:4.3-99, 1999; ФР.1.39.2003.00923, 2003; Plaza, 2005; Fjallborg, 2006). Однако результаты, полученные на водных экстрактах, могут недоучитывать тип и количество загрязняющих веществ (Roenpapel et al., 1998; Alonso, 2006). Кроме того, общая проблема методов биотестирования - это отсутствие адекватного подхода к математическому описанию результатов экспериментов.<sup>1</sup>

Минимизировать недостатки обоих подходов может использование методов контактного биотестирования. В настоящее время такие методы разработаны в основном для высших растений и животных (Feisthauer, 2005; Moreno, 2006), тогда как методы с использованием микроорганизмов - основных агентов круговоротов элементов - в России отсутствуют, а в Европейском Союзе и США находятся в стадии разработки. Перспективным, на наш взгляд, в качестве тест-объекта использовать микроорганизмы, относящиеся к роду *Bacillus*, которые являются типичными представителями микрофлоры плотных сред, в частности, почв, а в качестве тестовой функции рассматривать активность фермента дегидрогеназы, отражающего общую метаболическую активность клеток.

**Цель** данной работы - разработка метода контактного микробного биотестирования для оценки токсичности многокомпонентных плотных объектов.

### Задачи исследования.

1. Выбрать в качестве тест-объекта штамм, обладающий максимальной дегидрогеназной активностью и высокой чувствительностью к токсикантам, и осуществить его видовую идентификацию с использованием методов молекулярной биологии на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рДНК.
2. Разработать методику контактного биотестирования и определить метрологические параметры методики - прецизионность, повторяемость и интервалы концентраций стандартных токсикантов ( $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ), вызывающих 50% ингибирование тест-функции ( $\text{EC}_{50}$ ), в водных и почвенных образцах.
3. Определить адекватную математическую модель, описывающую результаты анализа водных и почвенных образцов различными методами биотестирования и методом оценки аборигенной микрофлоры.
4. Определить токсичность модельных почвенных образцов, загрязненных металлами, их смесью и органическим токсикантом, методом оценки активности аборигенной микрофлоры, методом контактного биотестирования с использованием *Bacillus pumilus*, методами элюатного биотестирования с использованием *B. pumilus*, инфузории *Paramecium caudatum* и ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* и оценить чувствительность методов анализа.
5. Разработать ранжировочную систему для отнесения промышленных и бытовых отходов к классам опасности и установить токсичность образцов промышленных отходов для *B. pumilus*, *P. caudatum* и *C. affinis*.

### Научная новизна.

Впервые предложена методика контактного биотестирования с использованием дегидрогеназной активности бактерии *B. pumilus* KM-21 для оценки опасности плотных объектов (почв и отходов). Стандартизованы условия культивирования тест-объекта, подготовки его к тестированию и операционные параметры реакции. Определены метрологические характеристики методики биотестирования - прецизионность, повторяемость и диапазон концентраций стандартных токсикантов ( $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ), вызывающих 50%-ный ответный отклик тестового параметра ( $\text{EC}_{50}$ ).

Впервые проведен сравнительный анализ пяти математических моделей зависимости «концентрация токсиканта - эффект» и показано, что наиболее адекватно описывает реальные результаты кинетическая модель неполного ингибирования.

Впервые на основе изучения различных способов определения токсичности почвенных образцов, искусственно загрязненных индивидуальными металлами, их смесью и органическим токсикантом, установлено, что разработанная методика контактного биотестирования с использованием *B. pumilus* KM-21 по чувствительности сопоставима с тестированием на основе аборигенной микрофлоры и превосходит метод элюатного биотестирования с использованием *B. pumilus* KM-21. Результаты

<sup>1</sup> Соруководитель работы в области математического моделирования - д.б.н., к.ф.-м.н., профессор Савельев А.А.

контактного теста более тесно коррелируют с результатами теста с аборигенной микрофлорой по сравнению с элюатным тестом.

Впервые с использованием разработанной методики определены границы токсичности отходов, позволяющие ранжировать их по классам опасности. Продемонстрировано, что контактный тест с использованием *B. pumilus* KM-21 дает возможность выявить большее количество отходов, относящихся к 2 и 3 классам опасности по сравнению с используемыми в настоящее время элюатными тестами на основе низших ракообразных *C. affinis* и простейших *P. caudatum*.

**Практическое значение работы.** По результатам проведенных исследований разработана, стандартизирована и подготовлена к аттестации в органах Госстандарта методика определения токсичности плотных объектов с использованием бактерии *B. pumilus* KM-21. Предлагаемая методика опробована для определения токсичности реальных образцов промышленных отходов, образующихся на предприятиях РТ.

Методика передана на апробацию в Центральную специализированную инспекцию аналитического контроля при МЭПР РТ и в Центральную заводскую лабораторию ОАО «КЗСК». Результаты исследований используются при проведении практических работ по курсам «Экологическое нормирование» и «Управление в обращении с отходами» на кафедре прикладной экологии Казанского государственного университета (КГУ), а также включены в учебное пособие «Теория и методы экологического нормирования» (2006), рекомендованное для обучения студентов и аспирантов экологического факультета КГУ.

Результаты, полученные в исследованиях, могут быть использованы для совершенствования системы почвенного мониторинга и при разработке мер по минимизации негативного влияния промышленных отходов на окружающую среду.

#### На защиту выносятся следующие положения:

- Разработанная методика контактного биотестирования плотных объектов (почв и отходов) с использованием дегидрогеназной активности бактерии *B. pumilus* KM-21 является более чувствительной в отношении ряда металлов, их смеси и органического токсиканта по сравнению с элюатной методикой с использованием того же тест-объекта и сопоставима по чувствительности с методикой на основе тестирования аборигенной микрофлоры.

- Установленные метрологические характеристики методики биотестирования (прецизионность и диапазон  $EC_{50}$  стандартных токсикантов), а также стандартные условия ее проведения позволяют рекомендовать методику для использования в различных лабораториях и получать сравнимые результаты.

- Для всех трех вариантов тестирования (контактное, элюатное биотестирование и оценка активности аборигенной микрофлоры) зависимость «концентрация токсиканта – вызываемый эффект» наиболее адекватно описывается кинетической моделью неполного ингибирования.

- Предложенный способ создания «суррогатного» контрольного образца дает возможность оценить степень негативного воздействия токсикантов в природных образцах и отходах при отсутствии идентичных незагрязненных образцов.

- Установленные границы токсичности, определяемые с использованием предлагаемой методики, позволяют ранжировать отходы по классам опасности для биологических объектов окружающей среды.

**Апробация работы.** Материалы работы изложены на II Международной научно-практической конференции «Экология: образование, наука, промышленность и здоровье» (Белгород, 2004), VI республиканской конференции «Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан» (Казань, 2004), Международных молодежных конференциях «Туполевские чтения» (Казань, 2004, 2005), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, 2005), Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы аграрной науки и пути их решения» (Ижевск, 2005), Всероссийской научной конференции «Современные аспекты экологии и экологического образования» (Казань, 2005).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 работ.

**Личный вклад автора в работу** состоит в выполнении экспериментальной части диссертации, обсуждении результатов и формулировании выводов на их основе. Соавторами публикаций являются научный руководитель д.б.н. Селивановская С.Ю., д.х.н., профессор, заведующий кафедрой прикладной экологии Латыпова В.З., сотрудники Гиссенского Университета (ФРГ) профессора Hummel H., Duering R.-A. и Gaeth S., сотрудник Кливлендского университета (Огайо, США) профессор Hung Y.-T., участвовавшие в обсуждении результатов. В создании программы для математической обработки результатов принимали участие д.б.н., профессор Савельев А.А. и к.х.н., с.н.с. Семанов Д.А.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 151 странице; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела собственных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 34 рисунка, 15 таблиц. Список литературы содержит 47 отечественных и 249 зарубежных источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы представлены современные сведения о способах оценки токсичности индивидуальных веществ, состояния почв и плотных антропогенных образований с использованием живых организмов. Рассмотрены методы биотестирования с использованием микроорганизмов, основанные на угнетении роста микробной культуры, ингибировании люминесценции и ферментные тесты, а также методы с использованием высших организмов. Уделено внимание публикациям, посвященным оценке состояния аборигенной микрофлоры почв, загрязненных

различными веществами, их влиянию на микробную биомассу, процессы трансформации углерода и азота в почве, ферментативную активность почв, на микробное разнообразие и устойчивость сообществ. Приведены данные о механизмах влияния металлов на микроорганизмы. В завершающей части обзора литературы представлены подходы к оценке опасности промышленных отходов для окружающей среды.

Представленные данные литературы свидетельствуют о стремительном распространении методов микробного анализа в рамках экотоксикологических исследований. Однако в литературе практически не представлены данные о разработке или применении методов контактного микробного биотестирования, являющихся одним из перспективных направлений современной прикладной экологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** служили 9 штаммов микроорганизмов, относящихся к роду *Bacillus*, полученных на кафедре микробиологии КГУ: *Bacillus* sp. KM-21, *Bacillus* sp. KM-5, *Bacillus* sp. KM-34, *Bacillus* sp. KM-3F, *Bacillus* sp. KM-16, *Bacillus* sp. KM-22, *Bacillus* sp. KM-4F, *Bacillus* sp. KM-13 и *Bacillus* sp. KM-6.

**Видовую идентификацию** осуществляли методами молекулярной биологии на основе анализа последовательности 16S рДНК. Идентификации подвергали штамм *Bacillus* sp. KM-21. Экстрагирование ДНК проводили с использованием буфера TE®, SDS®, протеиназы К, ацетата аммония, лизоцима, изопропанола и этанола. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали раствор Master Mix, праймеры MR for, MR rev и таг-полимеразу. ПЦР проводили в аппарате Biometra® T-Gradient. Секвенирование продукта ПЦР проводили согласно процедуре ABI PSISM Big Dye® с использованием флуоресцентных меток для нуклеотидных оснований Big Dye® и AmpliTag Polymerase FS® согласно Cycle Sequencing Kit ABI PRISM® в аппарате ABI PRISM® Genetic Analyser 310, тип геля POP-6™.

Обработку полученных хроматограмм проводили в программе Mega 3.1. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали базы данных [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Дегидрогеназную активность аборигенной микрофлоры почвы определяли методом Ленарда в модификации И.О. Колешко (1981).

Контактное биотестирование осуществляли в соответствии со следующей процедурой. К навеске образца 1 г приливали 1 мл 0,1М раствора глюкозы, 2 мл 0,1М фосфатного буфера (рН 7,2), 1 мл 1% раствора ТТХ и 1 мл бактериальной культуры. Смесь встряхивали и инкубировали 24 часа при 28°C. После инкубирования в реакционную смесь добавляли 5 мл этанола и центрифугировали при 4 тыс. об. мин. Надосадочную жидкость колориметрировали при 480 нм. Количество формазана находили по калибровочной кривой, построенной по чистому формазану.

Для того, чтобы избежать влияния окрашенных компонентов ростовой среды или почв, предусматривали так называемый “слепой контроль”, где 1 мл бактериальной

суспензии был заменен на 1 мл дистиллированной воды. Для контроля активности культуры (негативный контроль) (Ка) в каждой серии опытов предусматривали вариант, в котором почвенную навеску заменяли на 1 мл дистиллированной воды (контроль активности). В ряде случаев расчет относительной дегидрогеназной активности проводили относительно незагрязненной почвы (почвенного контроля) (Кп).

Для оценки токсичности рассчитывали ингибирование (I, %) или относительную активность ( $A_{отн}$ , %) и определяли  $EC_{50}$  или  $EC_{10}$ .

$$I (\%) = \frac{(\Phi_{Ка} - \Phi_{сКа}) - (\Phi_{пробы} - \Phi_{спробы})}{(\Phi_{Ка} - \Phi_{сКа})} \times 100, \text{ где}$$

$\Phi_{Ка}$  - усредненная концентрация формазана в пробе при оценке активности культуры;

$\Phi_{сКа}$  - усредненная концентрация формазана в слепой пробе при оценке активности культуры;

$\Phi_{пробы}$  - усредненная концентрация формазана в пробе;

$\Phi_{спробы}$  - усредненная концентрация формазана в слепой пробе.

При определении токсичности водных растворов токсикантов тестирование проводили, заменяя 1 г почвы на 1 мл водного раствора токсиканта.

При элюатном биотестировании для приготовления экстракта навеску 1 г разбавляли дехлорированной водой в соотношении 1:10, смесь встряхивали в течение 1 часа, отстаивали в течение 24 часов, затем фильтровали. Биотестирование проводили в соответствии с методикой, описанной выше, заменяя 1 г образца на 1 мл фильтрата.

Биотестирование почв и отходов с использованием *P. caudatum* и *C. affinis* осуществляли в соответствии с рекомендациями стандартизированных методик (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99, 1999; ФР.1.39.2003.00923, 2003).

**Анализируемые образцы.** Анализу подвергали: 1) водные растворы  $K_2Cr_2O_7$ ,  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $PbCl_2$ ,  $Cr_2O_3$ ,  $NiSO_4$ , фенола; 2) модельные почвенные образцы (тип почвы – серая лесная,  $C_{орг}$  - 0,76%), искусственно загрязненные  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $PbCl_2$ ,  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $NiSO_4$ ,  $K_2Cr_2O_7$ , фунгицидом альто-супер и комплексом металлов Pb, Cu, Cd, Ni (в виде указанных солей), до содержания в почве каждого из металлов на уровне 1, 5, 10 и 50 ОДК для песчаных и супесчаных почв; 3) незагрязненные почвы с различным содержанием органического вещества (0,16 - 1,6%); 4) модельные почвенные образцы, содержащие 0,16 и 1,6% органического вещества загрязненные  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 5) почвы, обработанные компостом в дозах 75 т/га и 150 т/га в условиях полевого эксперимента и контрольная почва, без внесения компоста; 6) модельные образцы отходов, содержащие такое количество загрязняющих веществ (металлов), которое позволило отнести их к граничным при определении класса опасности расчетным методом; 7) промышленные отходы ряда предприятий РТ.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2003, Origin 7.0. До проведения статистической обработки исходных

результатов проводили отброс значений по критериям Граббса и Кохрена в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002.

Для вычисления ЕС<sub>50</sub> и ЕС<sub>10</sub> использовали линейную и нелинейные модели. В первом случае ЕС<sub>50</sub> и ЕС<sub>10</sub> оценивали по линейному участку зависимости, построенной в координатах «натуральный логарифм концентрации элемента – ингибирование (%)» методом наименьших квадратов. В качестве нелинейных моделей для описания полученных результатов применяли две кинетических модели, предложенные Т.В. Speir с соавторами (1995), сигмоидальную модель, предложенную L. Haanstra с соавторами (1985) и логистическую модель (Abbondanzi et al., 2003).

$$v = \frac{c}{1 + b_i} \quad (\text{модель 1})$$

$$y = \frac{a}{1 + \exp^{b \times (x - c)}} \quad (\text{модель 3})$$

$$v = \frac{c(1 + a_i)}{1 + b_i} \quad (\text{модель 2})$$

$$y = \frac{k}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b} \quad (\text{модель 4})$$

Все модели были реализованы в пакете R. Gui, в программе, подготовленной профессором кафедры моделирования экологических систем КГУ А.А. Савельевым.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Выбор тест-объекта и его идентификация

При выборе тест-организма рассматривали бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*. Тест-функцией, по ответной реакции которой предполагалось оценивать токсичность, служила дегидрогеназная активность. В качестве тест-объекта необходимо было выбрать штамм, обладающий совокупностью следующих свойств: высокой активностью и чувствительностью по отношению к токсикантам. Определение дегидрогеназной активности изучаемых штаммов, находящихся в экспоненциальной фазе роста, позволило выявить, что наибольшую активность продемонстрировали штаммы *Bacillus* spp. KM-21 и KM-6 - 6,1 и 5,8 мг формазана/мл (табл. 1). Для скрининга изучаемых штаммов по уровню их чувствительности была определена их дегидрогеназная активность в присутствии растворов, содержащих различные концентрации неорганических загрязнителей (Pb, Cr (III), Ni), а также фенол. Поскольку ответные реакции штаммов варьировали в широких пределах, была применена бальная оценка полученных данных (табл. 1). Установлено, что по уровню чувствительности микроорганизмы составили следующий ряд: *Bacillus* sp. KM-16 > *Bacillus* sp. KM-34 > *Bacillus* sp. KM-21 > *Bacillus* sp. KM-3F > *Bacillus* sp. KM-4F > *Bacillus* sp. KM-13 > *Bacillus* sp. KM-5 > *Bacillus* sp. KM-22 > *Bacillus* sp. KM-6.

На основании полученных результатов в качестве тест-объекта был выбран штамм *Bacillus* sp. KM-21, поскольку он оказался на третьем месте по чувствительности к проанализированным токсикантам и проявил наибольшую дегидрогеназную активность.

Таблица 1

Дегидрогеназная активность штаммов *Bacillus* spp. в негативном контроле и в присутствии водных растворов стандартных токсикантов

Штамм <i>Bacillus</i> sp.	С(формазана), г/л	А отн., %			
		Pb, 400мг/л	Cr (III), 500мг/л	Ni, 150мг/л	фенол, 100мг/л
KM-5	3,9±0,6	23,8	23,8	71,4	60,0
KM-16	4,3±0,2	24,0	12,0	47,0	24,0
KM-22	3,9±0,4	44,4	26,7	71,1	44,4
KM-3F	3,6±0,5	22,7	6,0	81,0	22,7
KM-21	6,1±0,8	15,0	12,5	70,8	23,6
KM-4F	3,9±0,5	22,2	11,1	111,1	22,2
KM-13	4,6±0,2	24,1	10,0	74,1	37,0
KM-6	5,8±0,3	30,9	14,7	58,8	30,9
KM-34	4,1±0,5	12,5	12,5	70,8	22,9

Для видовой идентификации штамма, выбранного в качестве тест-объекта, был проведен молекулярный анализ и установлена нуклеотидная последовательность 16S рДНК. Результаты сравнения установленной последовательности с таковыми, содержащимися в базе данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), позволили идентифицировать изучаемый штамм как *Bacillus pumilus* (рис.1).

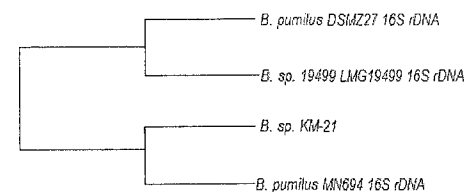


Рис. 1 Результаты сравнения нуклеотидных последовательностей штамма *Bacillus* sp. KM-21 и штаммов из базы данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

### 2. Определение операционных параметров методики контактного биотестирования и поправочного коэффициента

Для оптимизации методики измерения дегидрогеназной активности варьировали следующие параметры: присутствие в реакционной смеси субстрата реакции, CaCO<sub>3</sub>, концентрация ТТХ, использование буфера, количество экстрагента. Максимальная активность культуры установлена в варианте опыта, в котором присутствуют все компоненты реакционной смеси, за исключением CaCO<sub>3</sub>, и экстрагирование производится 5 мл этанола.

В процессе проведения биотестирования было обнаружено, что при тестировании незагрязненных почв, а также почв с низкими концентрациями токсикантов наблюдается увеличение уровня дегидрогеназной активности *B. pumilus* KM-21 по сравнению с негативным контролем (Ка), связанное, скорее всего, с присутствием в почве органического вещества (ОВ). В том случае, если задачей исследования является не только оценка токсичности всего образца в целом, но и оценка токсичности

вещества, содержащегося в образце, а незагрязненный образец отсутствует, на наш взгляд, возможно применение поправочного коэффициента для негативного контроля, учитывающего стимулирующий эффект ОВ на дегидрогеназную активность культуры. Для определения такого поправочного коэффициента были протестированы незагрязненные почвенные образцы с различным содержанием ОВ и установлена зависимость, позволяющая определять поправочный коэффициент в анализируемом образце (рис. 2).

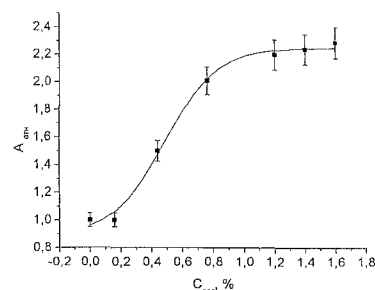


Рис. 2 Относительная дегидрогеназная активность *B. pumilus* при тестировании незагрязненных почвенных образцов с различным содержанием органического вещества

Очевидно, что стимулирующий эффект почвенных образцов зависит не только от содержания ОВ, но и от механического состава и других факторов, опосредованно влияющих на его доступность, равно как и на доступность токсичных веществ (Dag, Mishra, 1994; Perez et al., 2001; Ivask et al., 2004; Plaza et al., 2005). Однако, несмотря на вышеизложенное, мы считаем возможным использовать такой поправочный коэффициент для моделирования активности тестовой культуры в «суррогатном» контрольном образце.

### 3. Определение метрологических характеристик методики биотестирования

Для того, чтобы рекомендовать метод для широкого применения, необходимо установить его метрологические параметры, к числу которых относятся прецизионность и повторяемость метода. Оценку внутрилабораторной прецизионности ( $\sigma$ ) осуществляли для следующих методов: определение токсичности водных растворов стандартного токсиканта -  $K_2Cr_2O_7$  - на основе ингибирования дегидрогеназной активности *B. pumilus*, определение токсичности почвенных образцов, загрязненных этим же токсикантом, элюатным и контактным методами (рис. 3). Вычисленный параметр  $\sigma$ , позволил определить предел предупреждения метода. Установлено, что во всех вариантах методики значения относительной активности при всех концентрациях токсиканта выше предела предупреждения, что свидетельствует о достаточной прецизионности метода.

$$so = \frac{-1,37}{1 + \left(\frac{x}{0,48}\right)^{2,57}} + 2,25, \text{ где}$$

so- пересчетный коэффициент для Ка,  
x – содержание ОВ, %

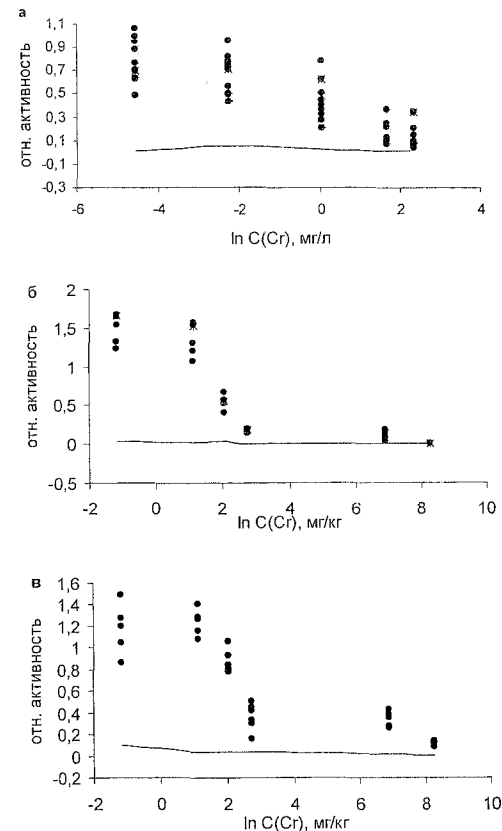


Рис. 3 Относительные значения дегидрогеназной активности (значения, полученные в эксперименте) и предел предупреждения при биотестировании водных растворов (а) и почв, загрязненных Cr (IV), контактным (б) и элюатным (в) методами

Поскольку Cr используется как стандартный токсикант в России, а зарубежные исследователи в этих целях рассматривают и другие элементы, аналогичные исследования проведены для водных растворов и почвенных образцов, загрязненных  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , протестированных контактным и элюатным методами. Результаты тестирования также продемонстрировали высокую прецизионность методик. В зарубежных публикациях характеристикой метода анализа является коэффициент вариации (CV). CV результатов анализа водных растворов  $K_2Cr_2O_7$  оказались более низкими по сравнению с таковыми, рассчитанными для результатов тестирования плотных сред (11, 23 и 17% соответственно). Аналогичные CV (10-15%) для результатов анализа жидких сред указаны F. Abbondanzi (2003) и A. Ivask (2004) с соавторами, а для плотных сред эти коэффициенты оказались более низкими по сравнению с представленными в литературе (Ivask et al., 2004), что свидетельствуют о хорошей повторяемости методики.

### 4. Определение адекватной модели описания результатов биотестирования и установление диапазонов концентраций стандартных токсикантов, вызывающих 50% ингибирующий эффект

Точность измерений при работе с биологическими объектами зависит не только от случайных погрешностей, обусловленных ошибкой измерения или подготовки проб, но и от состояния тест-объекта. Исходя из этого, необходима периодическая проверка чувствительности тест-объекта по отношению к стандартным токсикантам, при этом состояние культуры следует считать нормальным, если она отвечает стандартной

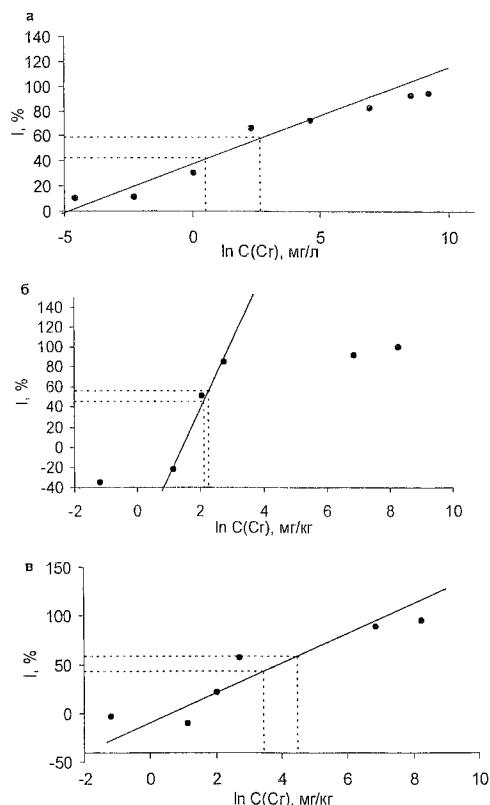


Рис. 4 Определение интервалов концентраций  $K_2Cr_2O_7$ , в пределах которых обнаруживается 50% ингибирование дегидрогеназной активности *B. pumilus* при тестировании водных образцов (а) и почв контактным (б) и элюатным (в) методами

Аналогичным образом были найдены интервалы концентраций токсиканта, содержащегося в почве, которые вызывают 50% ингибирование дегидрогеназной активности, при определении токсичности контактным и элюатным методами (рис. 4б и в). Указанные интервалы для Cr (VI) составили 1,7–14,4 мг/л, 8,18–9,56 и 31,4–81,68 мг/кг для водных растворов, а также для почвенных образцов, оцененных с помощью контактного и элюатного методов соответственно. Для Cd эти интервалы составили 0,01–0,53 мг/л, 3,07–3,30 и 221,4–1096,6 мг/кг соответственно.

Стандартный способ вычисления  $EC_{50}$  (по линейному участку зависимости «логарифм концентрации – ингибирование») не всегда позволяет адекватно оценить значения  $EC_{50}$ . Преодолеть недостатки этого метода возможно при использовании для

реакцией на определенную концентрацию токсиканта. Для установления интервала концентраций, при которых тест-объект демонстрирует 50% ингибирование тест-функции, нами использовались два стандартных токсиканта –  $K_2Cr_2O_7$  (рис. 4а) и  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ . В соответствии с нормативными документами РФ, для установления искомого интервала концентраций первоначально была построена зависимость погрешности измерения  $P$  от значений ингибирования дегидрогеназной активности и найдено соответствующее уравнение линейной регрессии. Из полученного уравнения была найдена погрешность измерения  $P_{50}$ , соответствующая 50%-ному ингибированию дегидрогеназной активности, затем был построен график и найдено уравнение регрессии для линейного участка зависимости ингибирования от натурального логарифма концентрации токсиканта. С использованием интервала ингибирования, рассчитанного по формуле  $50\% \pm 1,96P_{50}$  (для 95%-ной вероятности), определены соответствующие ему значения концентрации токсиканта (рис. 4а).

расчета  $EC_{50}$  нелинейных моделей. В литературе представлены некоторые модели (Haanstra, 1985; Speir et al., 1995; Abbondanzi, 2003; Moreno et al., 2002, 2006), однако сравнения их адекватности для решения конкретных задач проведено не было. Поэтому для определения  $EC_{50}$  нами были рассмотрены 4 нелинейных модели. Модель 1 описывает полное ингибирование, модель 2 – частичное ингибирование тестового параметра, модель 3 представляет собой сигмоидальную дозо-зависимую модель, модель 4 является логистической. Для определения доверительного интервала концентраций, вызывающих 50%-ный эффект, был использован перестановочный тест с числом перестановок 999. На рис. 5 представлены зависимости уровня относительной активности и концентрации Cr в почвенном образце (контактный метод биотестирования), полученные с помощью 4 моделей.

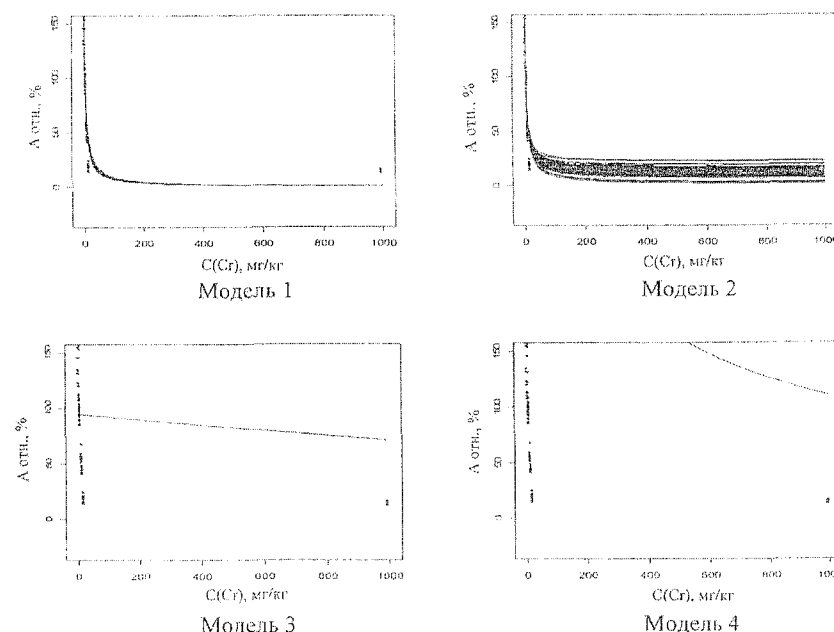


Рис. 5 Результаты перестановочного теста, полученные с помощью 4 нелинейных моделей, на примере модельных почвенных образцов, загрязненных Cr (контактное биотестирование)

Для того чтобы определить, какая из моделей наиболее адекватно описывает кривую «токсичность – концентрация вещества», были проведены уточняющие эксперименты. Для тех же концентраций токсикантов было проведено прогнозирование значений относительной активности с помощью 4 нелинейных моделей и уравнения линейной регрессии. На основании значений модулей разности прогнозных и реальных

значений была осуществлена оценка адекватности каждой из пяти моделей и установлено, что оптимальной является модель 2 (кинетическая модель неполного ингибирования). В пользу этой модели свидетельствует и то, что она удачно описывает все варианты биотестирования. Установленные при расчете по 2 модели интервалы концентраций, при которых наблюдается 50%-ное ингибирование тест-функции ( $EC_{50}$ ), составили для Cd и Cr (VI) 4,5-6 и 4,3-5,1 мг/л для водных растворов, 7,2-10,1 и 10,1-14,5 мг/кг для почвенных образцов при контактном биотестировании и 321,3-374,3 и 17,4-22,3 мг/кг – при элюатном биотестировании – соответственно.

5. Анализ токсичности почвенных образцов, содержащих индивидуальные металлы, их смесь и органический токсикант, методами контактного биотестирования с использованием *B. pumilus*, элюатного биотестирования с использованием *B. pumilus*, *P. caudatum* и *C. affinis*, а также методом оценки активности аборигенной микрофлоры

Для того, чтобы сравнить чувствительность разрабатываемого контактного теста с более распространенным элюатным методом и традиционным методом, основанным на оценке активности аборигенной микрофлоры почвенных образцов, нами были протестированы образцы почв, содержащие в качестве токсикантов  $K_2Cr_2O_7$ ,  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $PbCl_2$ ,  $NiSO_4$ ,  $Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$ , фунгицид альто-супер, а также смесь токсичных металлов (Cd, Cu, Ni, Pb), наиболее часто встречаемых в почвах РТ (Государственный доклад, 2004). Результаты тестирования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Интервалы значений  $EC_{50}$  при контактном и элюатном биотестировании почв, загрязненных  $Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$ ,  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $NiSO_4$ ,  $PbCl_2$ ,  $K_2Cr_2O_7$ , смесью токсикантов (Cu, Cd, Ni, Pb) и фунгицидом альто-супер

Токсикант	Интервалы значений $EC_{50}$ , мг/кг			
	Контактное биотестирование		Элюатное биотестирование	
	Ka	Kп	Ka	Kп
Cu	60,3-74,1	18,1-24,1	96,1-121,5	58,2-70,9
Cd	7,2-10,4	3,5-4,1	321,3-374,3	38,3-64
Ni	94,1-107,1	40,2-46,3	157-189,9	80,6-105,3
Pb	106,8-131,3	35,9-43,3	234,0-280,2	171,4-215,3
Cr (VI)	10,1-14,5	1,3-1,9	17,4-22,3	18,1-37,1
Смесь токсикантов	4,3-6,3	1,9-2,1	5,8-9,2	5,0-6,1
Альто-супер	14,4-23,5	3,8-6,2	81,0-87,0	40,6-76,7

Примечание. Ka - активность, оцененная с использованием в качестве контроля активности тестовой культуры в присутствии воды, Kп – активность, оцененная с использованием в качестве контроля активности тестовой культуры в присутствии незагрязненной почвы

Анализ полученных данных позволяет сделать несколько заключений. Во-первых, как при контактном, так и при элюатном тестировании значение  $EC_{50}$ , определенное на

основе набора данных относительной активности, рассчитанной с использованием Кп, оказалось ниже  $EC_{50}$ , определенной на основе набора данных, рассчитанных с использованием Ka (табл. 2). Такое различие обусловлено тем, что при расчете с использованием Кп мы элиминируем стимулирующий эффект, обусловленный присутствием ОБ. Во-вторых, токсичность металлов в отношении дегидрогеназной активности *B. pumilus*, оцененная контактным методом биотестирования, снижалась в ряду  $Cr \geq Cd > Cu > Pb \geq Ni$ . Данный ряд был практически идентичен при использовании обоих типов контроля. Ряд токсичности металлов, полученный при элюатном биотестировании выглядел следующим образом:  $Cr > Cd > Cu > Ni > Pb$ .

Важной выявленной закономерностью является то, что при одинаковых концентрациях токсиканта уровень ингибирования тест-функции существенно выше при проведении биотестирования контактным методом по сравнению с элюатным, что свидетельствует о большей чувствительности первого. Это утверждение подтверждается и определенными нами значениями  $EC_{50}$  (табл. 2). Согласно данным литературы, зачастую понятие биодоступности вещества или элемента отождествляют с их водорастворимостью. Полученные нами данные не согласуются с данной точкой зрения, поскольку при одинаковой исходной концентрации в почвенном образце уровень ингибирования при контактном методе биотестирования оказался в несколько раз выше по сравнению с элюатным методом. Так, например, такое превышение оказалось кратным 2 для Ni (концентрация 100 мг/кг), 2-3 для Pb (100 мг/кг), 1,3-1,8 для Cu (70 мг/кг), 14 для Cd (6 мг/кг) и 2-6 для Cr (16 мг/кг). Таким образом, можно заключить, что для бактерий, относящихся к роду *Bacillus*, биодоступными являются не только водорастворимые формы токсикантов.

Сравнение полученных нами данных с результатами, представленными в литературе, позволяет нам сделать заключение о большей чувствительности используемого нами метода биотестирования. Действительно, при попытке использования *Bacillus cereus* как предиктора биодоступности Cd, польскими авторами установлено, что его  $IC_{50}$  составляет 1,0-3,8 мг/г и варьирует в зависимости от типа почвы (Prokop et al., 2001). Не обнаружено негативного эффекта в отношении индукции люминисценции *B. subtilis* BR151-(pTOO24) при анализе суспензии почвы, загрязненной Cd в концентрации до 1,46 мг/кг и содержащей 34-39% ОБ (Ivask et al., 2004). Применение люминисцентного биосенсора, содержащего *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA1 luxAB, для анализа почв, содержащих Cu или Zn, выявило, что цинк вызывает 50% негативный эффект при его содержании в почве 403 мг/кг, тогда как Cu при содержании 349 мг/кг не оказывает эффекта (Chaudri et al., 2000).

Для того чтобы определить, насколько адекватны результаты, полученные методом контактного биотестирования, и действительно ли они отражают влияние токсиканта на почвенное микробное сообщество, нами в этих же образцах была определена дегидрогеназная активность, проявляемая аборигенной микрофлорой. Внесение всех неорганических токсикантов приводило к снижению дегидрогеназной



активности почвы. Наибольший негативный эффект выявлен в случае внесения Cr (рис. 6). На основании рассчитанных значений  $EC_{50}$  по снижению уровня негативного эффекта, оказываемого на аборигенную микрофлору, металлы составляют ряд: Cr (0,9 мг/кг) > Cd (3,6 мг/кг) > Cu (19,7 мг/кг) > Pb (23,6 мг/кг) > Ni (41,0 мг/кг). Внесение в почву смеси металлов до их содержания на уровне ОДК не привело к достоверному изменению уровня дегидрогеназной активности почвенного сообщества. Для того чтобы достичь практически полного ингибирования процесса необходимо увеличить суммарное содержание металлов до уровня, соответствующего 10 ОДК и выше.

При анализе аборигенной активности почв, загрязненных фунгицидом альто-супер выявлено, что при низком содержании (до 1 мг/кг) он стимулирует микробное сообщество, увеличивая дегидрогеназную активность на 25-35%. При дальнейшем увеличении содержания альто-супер в почве наблюдается дозо-зависимое снижение активности. Сравнение значений  $EC_{50}$  для ряда металлов и их смеси, полученных при контактном биотестировании и в опытах с аборигенной микрофлорой показывает, что уровни  $EC_{50}$  для Cd, Ni, Cu и смеси металлов практически одинаковы как в контактном биотестировании так и в тестах с использованием аборигенной микрофлоры. В случае Cr и Pb  $EC_{50}$ , установленные в контактном биотестировании оказались в 1,6 раз выше. При применении элюатного метода анализа различия в установленных значениях  $EC_{50}$  оказались существенно более высокими и составили в среднем 8,5 раз, что позволяет считать контактный метод предпочтительным по сравнению с элюатным.

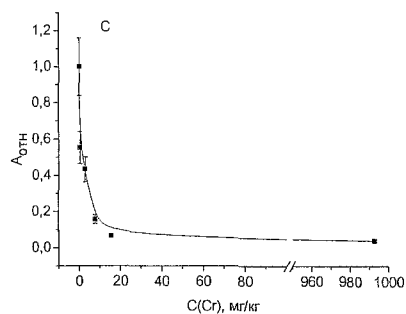


Рис. 6 Влияние  $K_2Cr_2O_7$  на дегидрогеназную активность серой лесной почвы

и результатов определения активности аборигенной микрофлоры коэффициент корреляции оказался существенно ниже ( $R=0,62$ ). Это свидетельствует о том, что контактный тест более адекватно отражает воздействие исследованных токсикантов на почвенную микрофлору. Несмотря на то, что большинство авторов отдает предпочтение оценке состояния объектов окружающей среды с привлечением методов, основанных на оценке аборигенной микрофлоры, до настоящего времени не решен вопрос о контрольном образце, который бы позволил определить степень негативного воздействия токсичных веществ. В этом плане контактное биотестирование позволяет

Коррелятивный анализ результатов биотестирования модельных почвенных образцов (контактным и элюатным методами с использованием *B. pumilus*) и активности аборигенной микрофлоры, произведенный на основе значений  $EC_{50}$ , выявил тесную корреляцию между результатами, полученными в контактном методе биотестирования и результатами анализа аборигенной микрофлоры ( $R=0,96$ ). В случае же сопоставления результатов, полученных в элюатном ана-

решить эту проблему, предложив в качестве контроля либо активность тестовой культуры, либо, так называемый, «суррогатный» образец. Впрочем, мы поддерживаем мнение ряда ученых (Chapman, 1996; Brohon et al., 2004), считающих, что наиболее оптимальным может быть сочетание обоих указанных методов, поскольку оно позволит преодолеть такие негативные стороны методов, как недостаточная экологическая релевантность биотестов и возможная адаптация или даже стимуляция аборигенной микрофлоры загрязненных почв.

Поскольку в РФ наиболее распространены тесты с использованием *P. caudatum* и *C. affinis*, на следующем этапе нами было проведено сравнительное исследование их чувствительности с чувствительностью тестов на основе *B. pumilus*. Биотестированию подвергли 14 модельных почвенных образцов, загрязненных  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  и  $K_2Cr_2O_7$ . Результаты тестирования представлены в табл. 3. Установлено, что в случае Cd предлагаемый тест обладает чувствительностью более высокой по сравнению с *P. caudatum* и сопоставимой с *C. affinis*. Так, например, при содержании Cd в почве 58 мг/кг для снятия ингибирующего эффекта потребовалось разбавление образца в 45, 133 и 153 раза в тестах с *P. caudatum*, *C. affinis* и *B. pumilus* соответственно. В случае же Cr чувствительность разрабатываемого теста оказалась несколько ниже в сравнении с таковой в тестах с гидробионтами.

Таблица 3

Токсичность модельных почвенных образцов, определенная в элюатных тестах с использованием *P. caudatum*, *C. affinis* и контактном тесте с использованием *B. pumilus*

ЭКр <sub>10</sub>							
Модельный почвенный образец	<i>P. caudatum</i>	<i>C. affinis</i>	<i>B. pumilus</i>	Модельный почвенный образец	<i>P. caudatum</i>	<i>C. affinis</i>	<i>B. pumilus</i>
НП	1	1	1	Cd, 0,25	1	1	1
Cr, 0,312	1	1	1	Cd, 1	1	1	1
Cr, 3,12	5	10	1	Cd, 3	1	2	4
Cr, 7,8	45	100	15	Cd, 5,8	3	13,3	15
Cr, 15,6	95	200	103	Cd, 11,6	10	20	20
Cr, 992,75	200	1000	115	Cd, 58	45	133,3	153
Cr, 3971	1000	5000	254	Cd, 232	98	200	211

#### 6. Использование методики контактного биотестирования для оценки класса опасности промышленных отходов

Один из возможных вариантов практического использования предлагаемой методики - определение класса опасности отходов. Для того, чтобы установить такую возможность, нами были протестированы 15 образцов промышленных отходов, образующихся на различных предприятиях РТ. Анализ токсичности отходов осуществляли двумя методами - контактном и элюатным (рис. 7). Выявлено, что в восьми случаях контактный тест оказался более чувствительным, чем элюатный. Максимальное соотношение результатов тестирования, полученных контактными и элюатными способами, составило 5,4 раз, что подтверждает наше предположение о том,

что в данных отходах содержатся токсичные компоненты, которые плохо растворимы в воде, однако способны оказывать негативное влияние на организмы. Для семи видов отходов достоверных различий ( $P < 0,05$ ) между относительными активностями, полученными контактными и элюатными способами, не выявлено.

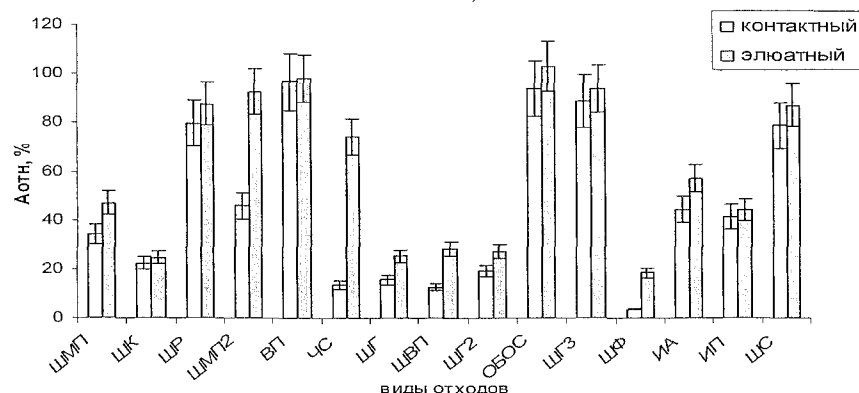


Рис. 7 Относительная дегидрогеназная активность *B. pumilis* в присутствии промышленных отходов, оцененная с использованием контактного и элюатного способов биотестирования

Если активность интродуцированной культуры составляла  $< 90\%$  от контроля, отходы подвергались разбавлению и последующему тестированию. Поскольку при определении класса опасности в качестве величины, используемой при ранжировании по классам, используют кратность разбавления отхода, не вызывающую негативного воздействия ( $ЭК_{p10}$ ), в данном блоке исследования мы рассчитывали этот параметр.

Практическое использование результатов биотестирования отходов возможно лишь при наличии информации о том, какие значения  $ЭК_{p10}$  являются граничными при отнесении отходов к различным классам опасности. Для создания ранжировочной таблицы, нами были найдены показатели  $ЭК_{p10}$  для модельных образцов отходов, специально загрязненных таким количеством металлов, которое при определении класса опасности расчетным методом, являлось граничным между 5 и 4 (отход К10), 4 и 3 (отход К100) и 3 и 2 (отход К1000) классами опасности (табл. 4).

Полученные результаты позволили нам произвести отнесение отходов и почвенных образцов к классам опасности (табл. 5). Для сравнения нами было проведено элюатное биотестирование этих же образцов отходов с использованием *P. caudatum* и *C. affinis*. Необходимо отметить, что отнесение к классам опасности по результатам биотестирования проводилось двумя способами: 1) в соответствии с нормативным документом «Критерии отнесения опасных отходов к классу опасности...» (2001); 2) в соответствии с рекомендациями, представленными в литературных источниках (Селивановская с соавт., 2001, 2004) и нашей ранжировочной таблицей.

Таблица 4

Ранжировочная таблица для отнесения отходов к классам опасности по результатам контактного биотестирования на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности *B. pumilis*

Класс опасности отхода	Кратность разведения образца, при которой наблюдается 10% ингибирование дегидрогеназной активности ( $ЭК_{p10}$ )
I-II	$ЭК_{p10} > 215$
III	$215 \geq ЭК_{p10} > 5$
IV	$5 \geq ЭК_{p10} > 1$
V	$ЭК_{p10} = 1$

Итоговый класс опасности, определенный методом биотестирования с учетом ранжировочной таблицы, представленной в нормативном документе, в 12 случаях из 15 совпал с классом опасности, установленным расчетным способом.

Таблица 5

Отнесение промышленных отходов к классам опасности

Название образца	Биотестирование с <i>P. Caudatum</i>			Биотестирование с <i>C. affinis</i>			Биотестирование с <i>B. pumilis</i>			Кл 3
	$ЭК_{p10}^*$	Кл1	Кл2	$ЭК_{p10}^*$	Кл 1	Кл 2	$ЭК_{p10}$	Кл 1	Кл 2*	
ШМП	1	5	5	1	5	5	30	4	3	4
ШК	9,5	4	4	43	4	4	45,9	4	3	2
ШР	10	4	4	89	4	4	4,2	4	4	4
ШМП2	1,54	4	4	5	4	4	17	4	3	4
ВП	2,78	4	4	7,14	4	4	1	5	5	4
ЧС	13,3	4	4	66	4	4	90	4	3	4
ШГ	4	4	4	35	4	4	103	3	3	3
ШВП	1,3	4	4	120	3	4	83	4	3	3
ШГ2	2,7	4	4	200	3	4	75	4	3	3
ОБОС	1	5	5	1	5	5	1	5	5	5
ШГЗ	2	4	4	16	4	4	1,2	4	4	4
ШФ	35,6	4	4	595,2	3	3	283	3	2	3
ИА	2,5	4	4	4	4	4	29	4	3	4
ИП	1	5	5	1,1	4	4	18	4	3	3
ШС	1,3	4	4	3,8	4	4	3,6	4	4	4

Примечание.  $ЭК_{p10}^*$  - данные предоставлены ЛАЭК КГУ, Кл1 – класс опасности, определенный согласно «Критериям отнесения опасных отходов к классу опасности...» (2001), Кл2 – класс опасности, определенный согласно литературным данным (Селивановская с соавт., 2001, 2004), Кл2\* - класс опасности, определенный согласно предложенной нами ранжировочной таблице, Кл3 - класс опасности, определенный расчетным способом

У трех образцов отходов расчетный класс опасности оказался более жестким, чем класс, установленный на основе биотестирования. В случае же использования

предлагаемой нами ранжировочной таблицы, количество отходов, у которых совпал класс опасности оказалось меньшим – девять образцов. При этом у пяти оставшихся отходов более жестким оказался класс, определенный методом биотестирования, и только в одном случае определяющим оказался расчетный метод. Полученные результаты могут свидетельствовать в пользу применения для определения класса опасности ранжировочной таблицы с индивидуальными интервалами ЭКР<sub>10</sub> для каждого тест-объекта, поскольку это позволяет выявить большее количество отходов, обладающих негативным воздействием на живые объекты окружающей среды.

При сравнении результатов отнесения отходов к классам опасности на основании биотестирования с использованием трех видов организмов установлено, что между результатами отсутствует достоверная корреляция ( $R = 0,16-0,67$ ). Такое отсутствие зависимости связано, скорее всего, с тем, что тест-организмы обладают дифференцированной чувствительностью к различным токсикантам, присутствующим в отходах, существование которых нам неизвестно. Этот факт подтверждает наше утверждение о необходимости использования системы тест-объектов для определения опасности объектов окружающей среды и отходов и совпадает с мнением ряда зарубежных и отечественных авторов (Bioassays..., 1995; Кабиров с соавт., 1997; Селивановская, Латыпова, 2004; Fernandez et al., 2006; Alonso et al., 2006).

При биотестировании с использованием *P. caudatum* и *C. affinis* к 5 и 4 классам опасности отнесены 100 и 93% всех протестированных отходов. Результаты контактного биотестирования с использованием бациллы позволили отнести к 5 и 4 классам только 33% отходов. Более того, по результатам контактного биотестирования один отход был отнесен ко 2 классу опасности. Таким образом, применение метода контактного биотестирования позволило выявить максимальное количество опасных отходов, что позволяет рекомендовать данную методику, после ее аттестации органами Государственного стандарта, к включению в систему тестов для оценки их класса опасности.

## ВЫВОДЫ

1. По уровню дегидрогеназной активности и ее чувствительности в отношении ряда металлов наиболее перспективным в качестве тест-объекта признан штамм *Bacillus* sp. KM-21, впоследствии идентифицированный на основе молекулярного анализа последовательности 16S рДНК как *B. pumilus*.

2. Высокая повторяемость результатов (коэффициент вариации 14%) обеспечивается за счет использования при биотестировании 38-40 часовой культуры с оптической плотностью 1,6 опт. ед. Методика обладает высокой прецизионностью и достаточной чувствительностью ( $EC_{50} Cr^{+6}$  1,5 мг/кг,  $EC_{50} Cd^{+2}$  3,8 мг/кг).

3. Наиболее адекватно описывает реальные результаты тестирования почв (контактное, элюатное биотестирование и оценка активности аборигенной микрофлоры) кинетическая модель неполного ингибирования, что свидетельствует о ее

предпочтительности по сравнению с традиционной моделью линейной регрессии, кинетической моделью полного ингибирования и двух сигмоидальных моделей.

4. По степени негативного воздействия в отношении дегидрогеназной активности *B. pumilus* KM-21 при контактном методе биотестирования металлы составляют ряд  $Ct \geq Cd > Cu > Pb \geq Ni$ , идентичный ряду, установленному при использовании теста с аборигенной микрофлорой.

5. На основе изучения различных методов определения токсичности почвенных образцов, искусственно загрязненных индивидуальными металлами, их смесью и органическим токсикантом, показано, что разработанный метод контактного биотестирования по чувствительности сопоставим с тестированием на основе аборигенной микрофлоры и превосходит метод элюатного биотестирования. Результаты контактного теста тесно коррелируют с результатами теста с аборигенной микрофлорой ( $R=0,96$ ), что свидетельствует о возможности замены последнего тестом с интродуцированной культурой *B. pumilus* KM-21.

6. По степени токсикорезистентности в отношении  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  тест-методы располагались в следующем порядке: тест с *P. caudatum* > тест с *C. affinis*  $\geq$  тест с *B. pumilus*, в отношении  $K_2Cr_2O_7$  – тест с *B. pumilus*  $\geq$  тест с *P. caudatum* > тест с *C. affinis*.

7. Использование ранжировочной системы для отнесения отходов к классам опасности для окружающей среды для результатов контактного биотестирования с *B. pumilus* KM-21 позволило распределить обследованные промышленные отходы следующим образом: 5 класс – 13%, 4 класс – 20%, 3 класс – 60%, 2 класс – 7%, тогда как при применении стандартных тестов с *C. affinis* и *P. caudatum* к 3 и 2 классу было отнесено лишь 7% отходов, что свидетельствует о большем потенциале предлагаемого нами метода.

## Основные публикации по теме работы

Работа, опубликованная в журнале из перечня ведущих рецензируемых изданий

1. Селивановская, С.Ю. Оценка токсичности плотных многокомпонентных сред с использованием контактного метода биотестирования [текст] / С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая // Токсикологический вестник. – 2006. – №4. – С. 12-15.

## Другие публикации

2. Selivanovskaya, S.Y. Suitability of organic wastes for land application with special regard to metal and organic contaminant contents in Tatarstan [текст] / S.Yu. Selivanovskaya, R.-A. Duering, V.Z. Latypova H. Hummel, S. Gaeth, P.Yu. Galizkaya // Environmental radioecology and applied ecology. - 2004. - №1. – Vol. 10. - P. 22-28.
3. Галицкая, П.Ю. Применение контактного метода биотестирования для оценки состояния почв и отходов [текст] / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Материалы II Международной научно-практической конференции «Экология:

- образование, наука, промышленность и здоровье». – Вестник БГТУ им. В.Г. Шухова, 2004. - №8. – С. 36-37.
4. Галицкая, П.Ю. Биологические методы оценки состояния почв: контактное биотестирование [текст] / П.Ю. Галицкая, Д.М. Шахмаева, С.Ю. Селивановская // Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан: Тез докл. VI республиканской конференции. - Казань, 2004. - С.54.
  5. Галицкая, П.Ю. Разработка контактного теста для оценки состояния твердых сред [текст] / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Материалы международной молодежной конференции «Туполевские чтения». - Казань, 2004 – Т.1. - С. 229.
  6. Галицкая, П.Ю. Оценка состояния почв с помощью аборигенной и интродуцированной микрофлоры [текст] / Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». – М.: МГУ, 2005. – Т.6. – С. 135-138.
  7. Галицкая, П.Ю. Микробный контактный тест для оценки состояния плотных сред, подверженных антропогенному воздействию [текст] / П.Ю. Галицкая // Материалы всероссийской научно-практической конференции 15-18 февраля 2005г. «Современные проблемы аграрной науки и пути их решения». - Ижевск, 2005. – Т. 2. –С. 140-143.
  8. Галицкая, П.Ю. Дегидрогеназная активность интродуцированной микрофлоры как адекватный показатель состояния плотных сред [текст] / П.Ю. Галицкая // Материалы Международной молодежной конференции «XX Туполевские чтения». – Казань, 2005. – Т.3. - С. 142-145.
  9. Селивановская, С.Ю. Теория и методы экологического нормирования [текст]: учеб. пособие / С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова, П.Ю. Галицкая. - Казань: КГУ, 2006. – 85с.
  10. Галицкая, П.Ю. Некоторые характеристики микробного контактного метода биотестирования [текст] / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Материалы Всероссийской научной конференции 19-23 сентября 2005г. «Современные аспекты экологии и экологического образования». – Казань, 2005. – С. 414-416.
  11. Галицкая, П.Ю. Преимущества и недостатки микробных контактных тестов [текст] / П.Ю. Галицкая // Вестник Татарстанского отделения Российской Экологической Академии. – 2005. - № 4(26). – С.55-60.
  12. Selivanovskaya, S.Yu. Microbial toxicity test for evaluating waste quality [текст] / S.Yu. Selivanovskaya, P.Yu. Galitskaya, Y.T. Hung, V.Z. Latypova // International Journal of Environmental Pollution. – 2006, in press.
  13. Галицкая, П.Ю. Определение метрологических характеристик микробного теста на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilus* / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Ученые записки Казанского Университета. Серия Естественные науки. – 2006. – Т. 148, кн. 2. – С. 63-72.

Отпечатано в ООО «Печатный двор».  
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207  
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.  
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.  
Выдана Поволжским межрегиональным  
территориальным управлением МПТР РФ.  
Подписано в печать 09.10.2006 г. Усл. п.л 1,44.  
Заказ № К-5429. Тираж 100 экз. Формат 60х84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать - ризография.